

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-111831

(43)Date of publication of application : 15.04.2003

(51)Int.Cl.

A61L 27/00

(21)Application number : 2002-216561

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 25.07.2002

(72)Inventor : IRIE HIROYUKI

INOUE AKIRA

FUJII KATSUYUKI

TANAKA TAKAAKI

KOMAKI HIROKAZU

(30)Priority

Priority number : 2001230334 Priority date : 30.07.2001 Priority country : JP

## (54) CARTILAGE IMPLANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cartilage implant providing good biocompatibility and excellent restorability.

SOLUTION: The cartilage implant is for implanting into a defect in cartilage. Gelled cartilage cells or marrow cells embedded in solubilized atelocollagen are integrated with a  $\beta$ -tricalcium phosphate porous body serving as a portion to be embedded into a bone during implantation, in such a way that the cells become a portion corresponding to the defect in cartilage during implantation. Using this system, the cartilage cells or marrow cells are cultured.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.05.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P) (12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号  
特開2003-111831  
(P2003-111831A)  
(43)公開日 平成15年4月15日(2003.4.15)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> 識別記号 F I テーグ(参考)  
A 6 1 L 27/00 A 6 1 L 27/00 G 4 C 0 8 1  
J

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願2002-216561(P2002-216561)	(71)出願人	000000376 オリンパス光学工業株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(22)出願日	平成14年7月25日(2002.7.25)	(72)発明者	入江 洋之 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ ンパス光学工業株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2001-230334(P2001-230334)	(72)発明者	井上 晃 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ ンパス光学工業株式会社内
(32)優先日	平成13年7月30日(2001.7.30)	(74)代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨軟骨移植材

(57)【要約】

【課題】 良好な生着性および優れた修復性が得られる骨軟骨移植材を提供すること。  
【解決手段】 骨軟骨欠損部に補填するための骨軟骨移植材であって、移植の際に骨内への埋植部となるβ-リン酸三カルシウム多孔体に、可溶化したアテロコラーゲンに軟骨細胞または骨髄細胞を包埋してゲル化したものを、移植の際に軟骨欠損部に相当する部分となるように一体化し、この系で前記軟骨細胞または骨髄細胞を培養してなることを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨軟骨欠損部に補填するための骨軟骨移植材であって、移植の際に骨内への埋植部となるβ-リン酸三カルシウム多孔体に、可溶化したアテロコラーゲンに軟骨細胞または骨髄細胞を包埋してゲル化したものを、移植の際に軟骨欠損部に相当する部分となるように一体化し、この系で前記軟骨細胞または骨髄細胞を培養してなることを特徴とする骨軟骨移植材。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、培養軟骨細胞を含む骨軟骨移植材に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 関節軟骨は、血管が組織内に存在せず、また、その細胞外基質により軟骨細胞の移動が妨げられるという組織学的な特色を有し、そのため、関節軟骨組織の損傷は、修復されないとされている。従って、整形外科の領域において、関節軟骨の欠損を修復することは、非常に困難である。

【0003】 関節軟骨の欠損を修復する従来の手法としては、同種軟骨移植なども行なわれているが、一般的には、ドリリングなどにより骨髄からの出血を促して、線維軟骨を形成させる試みなどで対応がされてきた。

【0004】 最近、膝関節において、あまり荷重のかからない領域から小円柱体状の骨軟骨片を複数個採取し、軟骨欠損部位を軟骨下骨からの出血が見られるまで十分に搔爬した後、これを移植する、モザイクプラスティと呼ばれる治療方法が広まり、良好な成績を示している。また、細胞移植による軟骨組織再生も研究が盛んになり、臨床での応用が進展しつつある。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、モザイクプラスティは、移植用の骨軟骨片の採取量に限界があるという欠点があるとともに、修復可能な軟骨欠損は、ほぼ4cm<sup>2</sup>であり、大きさに制限がある。

【0006】 培養軟骨細胞を移植する手法は、1994年にブリットバーク(Brittberg)らにより発表され、現在、米国において企業化されている。しかし、この手法は、細胞浮遊液を注入するものであり、単層培養による軟骨細胞の再分化能が充分かどうかの問題、また、欠損部での細胞の偏在の可能性、さらには術式上は欠損部を骨膜で覆って縫合し、フィブリン糊などで接着するが、隙間があれば浮遊液が漏れてしまう、などの問題点が指摘されている。

【0007】 これに対して、担体を用いて軟骨細胞、あるいは未分化の骨髄間葉系細胞を3次元的に培養し、これを移植することが検討されている。この手法では、担体の良し悪しが、軟骨再生、軟骨欠損の修復に大きく影響を及ぼす。しかし、軟骨細胞や骨髄細胞の培養に効果的な担体は、未だ見出されていない。

【0008】 本発明は、このような事情の下になされ、良好な生着性および優れた修復性が得られる、培養軟骨細胞を含む骨軟骨移植材を提供することを目的とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するため、本発明は、骨軟骨欠損部に補填するための骨軟骨移植材であって、移植の際に骨内への埋植部となるβ-リン酸三カルシウム多孔体に、可溶化したアテロコラーゲンに軟骨細胞または骨髄細胞を包埋してゲル化したものを、移植の際に軟骨欠損部に相当する部分となるように一体化し、この系で前記軟骨細胞または骨髄細胞を培養してなることを特徴とする骨軟骨移植材を提供する。

【0010】 以上のように構成される本発明の骨軟骨移植材において、β-リン酸三カルシウム多孔体に、骨形成蛋白質、繊維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インスリン様増殖因子、血小板由来増殖因子、および血管内皮細胞増殖因子からなる群から選ばれた少なくとも1種の細胞増殖因子を複合させることが可能である。

【0011】 また、本発明の骨軟骨移植材において、β-リン酸三カルシウム多孔体は、60～90%の気孔率、50～1000μmの連通したマクロポア、5μm以下のミクロポアを有することが望ましい。

【0012】 更に、β-リン酸三カルシウム多孔体は、メカノケミカル法により合成されたβ-リン酸三カルシウム粉末を原料として用いて、成形した後、焼結して得たものであることが望ましい。

【0013】 なお、軟骨細胞または骨髄細胞は、患者より採取したものであることが望ましい。

【0014】 以下、本発明について、より詳細に説明する。本発明に用いる移植用担体は、軟骨欠損部への移植片の生着性を向上させ、軟骨欠損部の修復性を向上させるため、軟骨細胞または培養骨髄細胞を3次元的に培養するための培養担体としてのコラーゲングル等、β-TCP多孔体を一体化または複合したことを特徴とする。

【0015】 この場合、担体を、円柱体状のコラーゲンスポンジの底面にβ-TCP円柱体を接着したものにより構成し、コラーゲン側の円柱体の高さを修復したい軟骨の厚さに相当するものとし、β-TCP側の円柱体の高さを軟骨下骨の外表面から骨髄に十分に達する深さに相当するものとするのが望ましい。

【0016】 β-TCPとコラーゲングル等との接着は、直接接触させて行うことも出来るが、例えば、可溶化したアテロコラーゲン、フィブリン糊等を接着面に塗布することにより行うことも可能である。これらの物質は培養担体とともに軟骨化の際、生分解するため、良好な生着性および優れた修復性に寄与するものである。

【0017】 本発明は、上述の担体を用い、コラーゲングル側、即ち培養担体において軟骨細胞あるいは骨髄細胞

胞を培養したものを、軟骨欠損部に補填する移植材を提供する。なお、骨髄細胞は、コラーゲンゲル等にのみ培養されるのではなく、 $\beta$ -TCPを含む担体全域において培養され、含まれてもよい。

【0018】このような移植材の軟骨欠損部への補填に際しては、軟骨の欠損に対し、軟骨下骨にも穿通、搔爬などを行って骨髄との連通を確保し、骨軟骨欠損を作製した後、 $\beta$ -TCP側が軟骨下骨にくるように行われる。

【0019】このように、本発明に係る移植材を軟骨欠損部に補填することにより、骨髄側からの血流により、コラーゲンゲル等による軟骨部の軟骨形成は促進され、骨側に補填した $\beta$ -TCPは骨伝導能と吸収性の性質を有しているため、経時的に自家骨に置換され、これにより移植片の生着性、軟骨欠損の修復能は向上する。

【0020】本発明において用いる $\beta$ -TCP多孔体は、軟骨下骨との癒合、経時的な自家骨置換を良好に得ることができる性状であることが望ましい。すなわち、 $\beta$ -TCP多孔体は、高純度で優れた骨伝導能と吸収性を有するものであることが望ましい。また、 $\beta$ -TCP多孔体は、連通気孔を有し、気孔率が60～90%、気孔径50～1000 $\mu$ mの全気孔の容積率が30～70%、5 $\mu$ m以下の全気孔の容積率が10～40%であるものが望ましい。

【0021】50～1000 $\mu$ mのマクロ気孔は、細胞の導入、血管新生などに寄与し、5 $\mu$ m以下のミクロ気孔は、吸収のされやすさなど化学的な作用を促進するのに寄与する。マクロ気孔は100～500 $\mu$ m、ミクロ気孔は1 $\mu$ m以下であることが更に望ましい。

【0022】自家骨置換能、すなわち優れた骨伝導能と吸収性は、 $\beta$ -TCPの製造プロセスによっても影響を受ける。本発明に好適に用いられる高純度の $\beta$ -TCPとしては、湿式粉砕法で作製されるものが、骨組織の代替材料として用いる材料の成分として優れている。

【0023】湿式粉砕法は、炭酸カルシウムとリン酸水素カルシウム2水和物をCaとPのモル比が1.5となるように秤量し、これらの粉末をボールミルにて湿式粉砕し、これにより得られるスラリーを乾燥し、その後720～900℃で焼成して $\beta$ -TCPを得るものである。この方法によれば、原料の秤量値によりCaとPの比を制御することができるとともに、純度が高く、かつ焼結性に優れた $\beta$ -TCPを得ることが出来る。

【0024】優れた骨伝導能と吸収性を有する $\beta$ -TCP多孔体は、以下のように作製することが出来る。即ち、湿式粉砕法により得た $\beta$ -TCP粉末に界面活性剤を加えて湿式発泡成形した後、乾燥し、950～1050℃の温度で焼成して、多孔体を得るものである。この方法により、連通気孔を有し、気孔率が60～90%、気孔径50～1000 $\mu$ mの全気孔の容積率が30～70%、5 $\mu$ m以下の全気孔の容積率が10～40%であ

る気孔性状を有する多孔質 $\beta$ -TCPを得ることが出来る。

【0025】このような $\beta$ -TCPとコラーゲンゲルを複合することで、軟骨欠損、骨軟骨欠損の修復能を向上させる培養軟骨細胞または骨髄細胞用の担体、およびそのような細胞を含む移植材を得ることが出来る。

【0026】本発明の骨軟骨移植材において、軟骨側の培養担体は、コラーゲンには限定されず、アルギン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の生分解性物質よりなる、高い連通性を有する3次元多孔質構造を有し、軟骨細胞あるいは骨髄細胞（例えば骨髄間葉系細胞）との親和性が高く、培養に適したものであれば、特に限定されない。

【0027】また上述の移植用担体に軟骨細胞、あるいは骨髄細胞を複合し、さらに細胞増殖因子を複合することにより、 $\beta$ -TCP側のさらに良好な骨形成と、軟骨側の細胞分化、組織再生を促進し、より早期の軟骨欠損の修復を実現することができる。

【0028】なお、細胞増殖因子としては、骨形成蛋白質（BMP：Bone Morphogenetic Protein）、繊維芽細胞増殖因子（FGF：Fibroblast Growth Factor）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- $\beta$ ：Transforming Growth Factor- $\beta$ ）、インスリン様増殖因子（IGF：Insulin-like Growth Factor）、血小板由来増殖因子（PDGF：Platelet Derived Growth Factor）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF：Vascular Endothelial Growth Factor）などを用いることができる。

【0029】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

【0030】＜第1の実施の形態＞炭酸カルシウム粉末とリン酸水素カルシウム2水和物をモル比で1：2の割合で秤量し、純水とともにボールミルポットに入れ、約1日、ボールミルにて混合粉砕した。得られたスラリーを約80℃で乾燥し、その後750℃で焼成した。得られた粉末は、焼結性に優れた高純度の $\beta$ -TCPであった。

【0031】この粉末重量部に、純水と、アクリル酸アンモニウム系の解膠剤と、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系の界面活性剤を適量添加し、混合攪拌して発泡スラリーを調製した。

【0032】この発泡スラリーを乾燥し、その後1050℃で焼成して、 $\beta$ -TCP多孔体を得た。この $\beta$ -TCP多孔体は、75%の気孔率を有し、100～400 $\mu$ mおよび1～0.1 $\mu$ mの2つの領域に気孔径分布を有するものであった。

【0033】このようにして作製した $\beta$ -TCP多孔体を、 $\phi$ 4×6mmの円柱体状に加工し、その底面に $\phi$ 4×3mmの円柱体の軟骨細胞培養用スポンジ状コラーゲンゲルを接着し、担体を得た。接着は、 $\beta$ -TCP多孔



質円柱体の底面に可溶化したアテロコラーゲンを冷却下で塗布し、貼り合わせた後に、37℃にてゲル化させることにより行った。

【0034】また、 $\beta$ -TCP多孔質円柱体に、同じサイズの3次元多孔質ポリ乳酸の円柱体を接着させ、担体を得た。接着は、 $\beta$ -TCP側を130℃に加熱し、ポリ乳酸に押し付け、ポリ乳酸の接着面を融解させることにより行った。

【0035】これらの担体を用い、コラーゲン、ポリ乳酸側で軟骨細胞を培養し、兎の膝関節に $\phi$ 4mmの骨軟骨欠損を作製し、 $\beta$ -TCP側を骨側になるように移植して、経過観察したところ、早期の骨形成、軟骨形成が見られ、良好な関節軟骨の修復が得られた。

【0036】＜第2の実施の形態＞第1の実施の形態において作製した $\beta$ -TCP多孔体と、コラーゲングルと、培養軟骨細胞とを用いた骨・軟骨柱を作製し、関節軟骨の修復を試みた。

【0037】まず、ウサギ膝関節軟骨より軟骨片を採取し、プロナーゼ、コラゲナーゼによる酵素処理を行い、軟骨細胞を分離した。次いで、分離された軟骨細胞を、DMEM (Delbecco's Modified Medium) + 10% FCS + 抗生剤により、2～3週間、単層培養を行って増殖した後、トリプトシン処理を行い、軟骨細胞を回収した。

【0038】次に、 $10^6$ 個の軟骨細胞を0.1mlの2×DMEM+20%FCS中に浮遊させ、これに等量の3%アテロコラーゲン溶液を混合したものを、第1の実施形態と同様に作製した $\phi$ 4×6mmの $\beta$ -TCPブロック柱上に滴下し、コラーゲンをゲル化し、37℃で1～14日間培養を行った。

【0039】このようにして、高さ約1～2mmの軟骨層を有する $\beta$ -TCP・軟骨複合体を作製した。

【0040】そして、ウサギ大腿骨膝蓋面に、骨髄に達する直径4.3mm、深さ7mmの骨・軟骨欠損をドリルにて形成した。この骨・軟骨欠損にプレスフィットするように、上記 $\beta$ -TCP・軟骨複合体を充填した。術後、4, 8, 12, 20週で屠殺し、各群について組織学的検索を行った。

【0041】術後4週では、 $\beta$ -TCPブロックの骨髄側の約半分は吸収されて、骨に置換されていたが、表層側では多数のTRAP陽性細胞に取り囲まれた形で残存していた。また、軟骨細胞は、 $\beta$ -TCPブロック上に不規則に配列していた。

【0042】術後8週以降は、時間の経過とともに $\beta$ -TCPは吸収され、 $\beta$ -TCPの周囲から旺盛な骨の形成が認められ、欠損部周囲の骨と新生骨が癒合していた。一方、軟骨細胞層においては、ほぼ均一な軟骨細胞が不規則に存在していた。

【0043】しかし、術後12週になると、最表層には紡錘状の細胞が層状に配列し、深層では肥大化した大型

の軟骨細胞が配列するという正常の関節軟骨の構造に類似したりモデリングが生じていた。また、軟骨基質は、最表層はサフラニンOで染色されなかったが、中間層から深層はサフラニンOに強く染色され、豊富なプロテオグリカンの合成が認められた。

【0044】術後12週から20週では、僅かに残存する $\beta$ -TCPに接して軟骨細胞層が存在していた。

【0045】以上の結果から、 $\beta$ -TCP・軟骨複合体を骨・軟骨欠損部に充填すると、軟骨下骨から骨髄内に存在する $\beta$ -TCPは、骨髄側から速やかに骨に置換され、周囲の軟骨下骨と癒合することがわかった。一方、コラーゲングル内の軟骨細胞は、 $\beta$ -TCP上で細胞の形態と配列を構築することが認められた。このような変化は、単なる軟骨細胞移植後にはみられず、本発明の手法は、新たな関節軟骨修復法になり得るものである。

【0046】以上のように、本発明の手法は、in vitroで骨・軟骨柱を作製して関節軟骨の修復を行うものであり、移植片の生着、手術侵襲の点からも有利である。軟骨下骨から骨髄内に存在する $\beta$ -TCPは、骨髄内の間葉系細胞により速やかに骨に置換された。また、 $\beta$ -TCPは、関節軟骨の基質合成や増殖に悪影響を及ぼすことはなかった。軟骨細胞の形態及び配列の変化が $\beta$ -TCPの影響であるか否かは必ずしも明確ではないが、本発明の手法は、新たな関節軟骨修復法として臨床応用可能である。

【0047】＜第3の実施の形態＞上述した第1の実施の形態および第2の実施の形態において、 $\beta$ -TCP多孔体と細胞増殖因子とを複合し、これを兎の膝関節に $\phi$ 4mmの骨軟骨欠損に移植して経過観察したところ、 $\beta$ -TCP側の骨形成、軟骨側の再生は促進した。細胞増殖因子の $\beta$ -TCPへの複合は、細胞増殖因子を緩衝液などに溶解し、この溶液を移植前に $\beta$ -TCPに染み込ませることにより行った。

【0048】細胞増殖因子として、BMP、FGF、TGF- $\beta$ 、IGF、PDGF、VEGFをそれぞれ用いたが、いずれも $\beta$ -TCP側の良好な骨形成と、軟骨側の細胞分化、組織再生が促進され、より早期の軟骨欠損の修復を実現することができた。

【0049】なお、本発明は、以下のような種々の構成を採り得る。

【0050】1. 骨軟骨欠損部に培養軟骨細胞または培養骨髄細胞を移植するための担体であって、移植の際に骨内への埋植部となる $\beta$ -リン酸三カルシウム多孔体と、コラーゲングル、アルギン酸、多孔質ポリ乳酸、および多孔質ポリグリコール酸からなる群から選ばれた少なくとも1種からなる、軟骨細胞あるいは骨髄細胞を培養するための培養担体とを一体化してなることを特徴とする培養軟骨細胞または培養骨髄細胞移植用担体。

【0051】2. 骨軟骨欠損部に補填するための骨軟骨移植材であって、移植の際に骨内への埋植部となる $\beta$ -

リン酸三カルシウム多孔体と、前記軟骨欠損部に相当する部分となる、コラーゲンゲル、アルギン酸、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸からなる群から選ばれた少なくとも1種からなる培養担体とを一体化してなり、前記培養担体において培養された軟骨細胞あるいは骨髄細胞を含むことを特徴とする骨軟骨移植材。

【0052】3. 骨軟骨欠損部に補填するための骨軟骨移植材であって、移植の際に骨内への埋植部となるβ-リン酸三カルシウム多孔体と、前記軟骨欠損部に相当する部分となる、コラーゲンゲル、アルギン酸、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸からなる群から選ばれた少なくとも1種とを一体化してなる担体からなり、前記担体において培養された骨髄細胞を前記担体全域に含むことを特徴とする骨軟骨移植材。

【0053】4. 上記2または3において、β-リン酸三カルシウム多孔体に、骨形成蛋白質、繊維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インスリン様増殖因子、血小板由来増殖因子、および血管内皮細胞増殖因子からなる群から選ばれた少なくとも1種の細胞増殖因子を複合させたことを特徴とする骨軟骨移植材。

【0054】5. 上記2～4において、β-リン酸三カルシウム多孔体は、60～90%の気孔率、50～10

00μmの連通したマクロポア、5μm以下のミクロポアを有することを特徴とする骨軟骨移植材。

【0055】6. 上記2～4において、β-リン酸三カルシウム多孔体は、メカノケミカル法により合成されたβ-リン酸三カルシウム粉末を原料として用いて、成形した後、焼結して得たものであることを特徴とする骨軟骨移植材。

【0056】7. 上記2～4において、軟骨細胞または骨髄細胞は、患者より採取したものであることを特徴とする骨軟骨移植材。

【0057】

【発明の効果】以上、詳細に説明したように、本発明によれば、β-TCPとコラーゲンゲルとを複合した担体を用いることにより、培養軟骨細胞、骨髄間葉系細胞を骨軟骨欠損部に移植することで、良好な生着性、優れた修復性が得られる培養細胞移植用担体、および培養細胞を含む骨軟骨移植材を得ることができる。

【0058】特に、本発明に係る移植材は、その形状および大きさに制限なく作成することが出来るため、従来の自家組織を用いた骨軟骨移植に比べ、極めて有利である。

フロントページの続き

(72)発明者 藤井 克之

東京都渋谷区神宮前3-11-13

(72)発明者 田中 孝昭

東京都新宿区新宿5-7-14-402

(72)発明者 小牧 宏和

千葉県柏市光ヶ丘団地3番8-406

Fターム(参考) 4C081 AB04 AB05 AC03 BA12 BA13

CD12 CD34 CF02 DA01 DA02

DB03